Lane Medical Library

ZUR FRAGE DES NACHWEISES VON ERGOSTERIN UND ANTIRACHITISCHEM PRINZIP INNERHALB UND AUSSERHALB DES ORGANISMUS

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

IN DER

GESAMTEN MEDIZIN

VERFASST UND EINER

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

BAYRISCHEN LUDWIG MAXIMILIAN UNIVERSITÄT

ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON

LEO SCHINDEL

AUS MÜNCHEN

VERLAGSBUCHHANDLUNG JULIUS SPRINGER IN BERLIN. 1929

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Bayrischen Ludwig Maximilians Universität München.

Referent: Geh.-Rat Prof. Dr. M. v. Pfaundler

Sonderdruck aus „Zeitschrift für Kinderheilkunde“, Bd. 48, H. 5

Inhaltsverzeichnis.

Einleitung (S. 451).
1. Biologische Nachweismöglichkeiten durch den Tierversuch (452).
2. Chemische Versuche mit bestrahltem und unbestrahltem Ergosterin (S. 457).
3. Physikalische (optische) Messungsmethoden (S. 467).
4. Ergosterinbestimmung in Cholesterinen aus verschiedenen menschlichen Organen (S. 473).
5. Anhang. Nachweis des antirachitischen Prinzipes durch klinische Methoden (S. 475).
Zusammenfassung (S. 478).
Literaturverzeichnis (S. 479).

Während der letzten 5 Jahre folgte in einer fast unübersehbaren Reihe Arbeit auf Arbeit, welche die bis dahin scheinbar zu einem Abschluß gekommene Rachitisforschung von neuem belebte. Das Ergebnis dieser vielen, aus aller Herren Länder stammenden Untersuchungen stellt eine weitgehende Synthese der mannigfachsten, widerspruchsvoll erschienenen Meinungen über die Ätiologie der Rachitis dar. Und auch das Gegensätzliche im Wirkungsmechanismus klimatischer, physikalischer, diätetischer und medikamentöser Heilerfolge bei der Rachitis ließ sich auf eine gemeinsame Formel bringen.

Hess und seine Mitarbeiter konnten die bald von vielen Seiten bestätigte Mitteilung machen, daß nach klinischen und experimentellen Versuchen ultraviolett bestrahlte Nahrung antirachitisch wirksam wird. Die Analyse dieses Vorganges führte zu dem Befunde, daß die Aufladung einer Nahrung zu antirachitisch wirksamer Substanz an die Cholesterinfraktion gebunden ist. In mühevoller Forschung gelang es der genialen Zusammenarbeit der Deutschen *Windaus* und *Pohl* mit *Hess* in Amerika und *Rosenheim-Webster* in England auf Grund physikalischer Beobach-

tungen zu zeigen, daß dem Cholesterin — gewissermaßen als Verunreinigung — das Ergosterin beigemengt ist, das nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht zum antirachitischen Prinzipe wird. Nach den bisherigen Forschungsergebnissen scheint das Ergosterin die einzige Substanz zu sein, die während der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht diese Veränderung im Sinne antirachitischer Wirksamkeit erfährt.

Während das Ergosterin schon seit längerer Zeit dem Chemiker bekannt ist und einwandfreie Konstanten zeigt, ist es bis heute noch nicht möglich geworden, ein gleichmäßig wirksames und genau definiertes, „bestrahltes Ergosterin" darzustellen. Die Untersuchungen über die Veränderungen während der Ultraviolettbestrahlung am Ergosterinmolekül sind in vollem Flusse.

1. Biologische Nachweismöglichkeiten durch den Tierversuch.

Die Kontrolle, ob eine antirachitisch wirksame Substanz vorliegt, war dadurch erleichtert worden, daß es gelang, innerhalb von Wochen bei Ratten ein Krankheitsbild zu erzeugen, das der kindlichen Rachitis sehr ähnlich ist und sich auch durch die gleichen therapeutischen Maßnahmen beeinflussen läßt. Durch diese Entdeckung war es möglich geworden, an die quantitative Bestimmung einer antirachitisch wirksamen Substanz zu denken.

Das Prinzip der rachitiserzeugenden Kost beruht auf einer Verschiebung des Salzgehaltes in der Nahrung. Schon lange hatte man sich bemüht, bei Tieren durch Änderung des Salzgehaltes in der Nahrung Rachitis zu erzeugen. Versuchstier war vorzugsweise der Hund. Nach *Aron* und *Dibbelt* sollte Kalkarmut in der Nahrung zu rachitisähnlichen Knochenveränderungen führen. *Heubner* und *Lipschütz* glaubten dagegen, bei phosphorarm ernährten Hunden eine der Rachitis ähnliche Skeletterkrankung erzeugt zu haben. Abweichend von diesen Versuchen, die darauf abzielten, durch Veränderung des Salzgehaltes in der Nahrung bei Tieren Rachitis zu erzeugen, fütterte *Mellanby* seine Versuchstiere mit einer von fettlöslichem Vitamin freien Nahrung. Auch diese Hunde sollten ein der Rachitis entsprechendes Bild geboten haben. Die vielfachen experimentellen Untersuchungen über diese rachitisähnlichen Krankheitsbilder konnten jedoch nicht befriedigen. Alle beobachteten Skelettveränderungen wurden von den Nachuntersuchern meist als Osteoporose gedeutet. Erst nach dem Kriege haben die Amerikaner, vornehmlich *McCollum* und seine Schule, *Shermann-Pappenheimer* sowie *Steenbock* und Mitarbeiter Kostformen angegeben, die bei Ratten wirklich zu einer der kindlichen Spontanrachitis sehr ähnlichen Skelett- und Stoffwechselstörung führten. In diesen Nahrungsgemischen ist das Verhältnis von $\frac{Ca}{P}$ zugunsten des Calciums verschoben. Neben diesem relativen Ca-Überangebot war die Nahrung frei von fettlöslichem Vitamin.

Zur Erzeugung der sog. experimentellen Rattenrachitis sind heute vornehmlich 3 Kostformen in Gebrauch, die alle durch Verschiebung des $\frac{Ca}{P}$-Faktors in der Nahrung nach unseren Erfahrungen an über 700 Tieren brauchbare Rachitisbilder liefern. Die von *Steenbock-Black* angegebene Rachitiskost ruft besonders schwere histologische und serologische Veränderungen hervor, jedoch werden die Tiere sehr dystrophisch und gehen häufig schon während des Versuches zugrunde. Die von *Shermann-Pappenheimer* angegebene Kostform Nr. 84 leidet sehr daran, daß auch hier wegen der calorienarmen Nahrung und des Appetitverlustes der Tiere häufig wichtige Kontrollen sterben. Am besten bewährt hat sich uns zur Erzeugung der experimentellen Rattenrachitis die McCollum-Kost Nr. 3143, die weitaus am häufigsten ein Gedeihen der Tiere garantiert und überdies meist schwere rachitische Bilder liefert.

Bei allen diesen Standardkosten haben wir es immer wieder gesehen, daß trotz Einhaltung vollkommen gleicher Versuchsbedingungen jeder Wurf verschieden schwer rachitisch wird. Wir haben in den letzten beiden Jahren in den Monaten September bis November fast nie ein rachitisches Tier bekommen[1]. Worauf dieser individuelle und auch an Jahreszeiten gebundene wechselvolle Verlauf beruht, dürfte besonders interessieren. Diesen Fragen wird heute gerade im Hinblick auf die individuellen klinischen Rachitisformen nachgegangen. Bei dieser Unsicherheit der experimentellen Rattenrachitis ist es schwer, vergleichend Versuche zu werten, die nicht an ein und demselben Wurfe vorgenommen worden sind. Aber auch innerhalb eines Wurfes selbst bleibt die feine quantitative Bestimmung einer antirachitisch wirksamen Substanz ungenau. Dem Rattenversuch haftet weiterhin der Mangel an, daß für eine Bestimmung ein Zeitraum von 2—3 Wochen nötig wird. In der letzten Zeit sind nach dem Bekanntwerden der erwähnten Kostformen allenthalben Erfahrungen gesammelt und in der Literatur niedergelegt worden. Die Absicht der meisten Arbeiten galt dem Versuch, zu einer allgemein gültigen Standardisierung einer antirachitisch wirksamen Substanz durch den Rattenversuch zu kommen. Vielfach sind dabei die anderwärts gleichfalls beobachteten Schwankungen im Rattenversuch nicht mit genügender Schärfe berücksichtigt worden. Nach den bisherigen Forschungsergebnissen hat sich jedoch mit gewissen Vorbehalten der biologische Nachweis im Rattenversuch verwerten lassen. Meist wurden die Befunde auch durch die am kranken Kinde nachweisbaren

[1] Ein Zufallsbefund soll an dieser Stelle kurz mitgeteilt werden. Als in einem Rattenraum mit Vigantol offen gearbeitet wurde, ließ sich trotz Einhaltung gleicher Versuchsbedingungen ebenfalls keine Rachitis experimentell erzeugen. Rachitische Ratten heilten ohne bewußte therapeutische Maßnahmen. Es muß also durch die Luft bereits bestrahltes Ergosterin antirachitisch wirksam sein. Siehe auch *Schmidtmann.* Klinische Versuche sind bereits geplant.

antirachitischen Erfolge gestützt. Da eine Verschiebung des Mineralfaktors in der Nahrung zugunsten des Ca bei der Ratte im Gegensatz zum Kinde zur Rachitis führt, darf in den Rattenversuchen die zu prüfende Substanz niemals den Mineralfaktor des Nahrungsgemisches in der Weise verändern, daß keine Rachitis entstehen kann. Deshalb hat *Zoeller* bei Untersuchungen über den antirachitischen Schutzstoffgehalt der Milch zunächst durch eine Analyse der Milch den $\frac{Ca}{P}$-Faktor bestimmt und durch Ca-Zulage das Verhältnis von Ca : P der rachitiserzeugenden Grundkost angenähert.

Da sich trotz mancher Unterschiede von Spontanrachitis und experimenteller Rattenrachitis, für die neuerdings *Ullrich* wichtige Versuchsergebnisse mitgeteilt hat, beide Rachitisbilder durch die gleichen therapeutischen Maßnahmen beeinflussen ließen, ist unser Wissen über den antirachitischen Schutzstoff in einem Tempo erweitert worden, wie es durch rein klinische Beobachtungen nicht möglich gewesen wäre.

Bei der Ausführung des Rattenversuches werden heute zwei voneinander abweichende Wege beschritten. *Poulsson*, der als erster den experimentellen Rattenversuch zu einer quantitativen Bestimmungsmethode ausgearbeitet hat, läßt die aus einem Wurf stammenden weißen Ratten 14 Tage auf Rachitiskost und beurteilt dann röntgenologisch nach dem Aussehen der Tibiaepiphysenlinie den Grad der bestehenden Rachitis. Während der folgenden 14 Tage wird dann die zu prüfende Substanz in absteigenden Mengen zur Bestimmung der Grenzdosis beigegeben. Die gleiche Versuchsanordnung benützt auch *Coward*, die neben der Röntgenkontrolle durch Ausfällung des Ca im histologischen Schnitt die Schwere der Rachitis wertet. Dieser „line test" hat sich als ergänzende Kontrolle bewährt.

Auch *O. Schultz* hält den Rachitisheilversuch an der Ratte für einen brauchbaren Weg zur Standardisierung antirachitisch wirksamer Substanzen. Eine antirachitische Vitamineinheit (D.V.E.) ist nach ihm die kleinste Menge eines antirachitisch wirksamen Stoffes, die innerhalb 21 Tagen eine ++++ Rachitis bei der Ratte in eine Ø Rachitis zu verwandeln vermag.

Bei dem anderen Verfahren wird einem Teil der Tiere zur Rachitiskost von vornherein die zu untersuchende Substanz zur Bestimmung der Grenzdosis zugegeben. Nach 14 Tagen hört dieser prophylaktische Versuch auf, und die Wirksamkeit der geprüften Substanz wird röntgenologisch mit Kontrollen verglichen, die während dieses zweiwöchigen Versuches nur auf Rachitiskost gesetzt waren. *Scheunert* glaubt, durch das Ansetzen von je 10 Tieren für eine zu prüfende Dosis die von ihm gleichfalls beobachteten individuellen Schwankungen der Rachitisbilder einigermaßen zu korrigieren. Sind 8 der gleichbehandelten 10 Ratten

bei diesem Versuche gleichsinnig zu werten, so gilt der Versuch als brauchbar.

Die von *Scheunert-Schieblich* angegebene Versuchsanordnung wird heute zur Standardisierung des Vigantols, eines industriell hergestellten bestrahlten Ergosterinpräparates für medizinische Zwecke, unter den gemachten Einschränkungen benützt. Diejenige kleinste Dosis des Präparates, die 8 von 10 Ratten eben vor der durch McCollum-Kost Nr. 3143 bei den Kontrolltieren erzeugten Rachitis schützt, wird als eine biologische Einheit bezeichnet. Für die Bedürfnisse der Praxis und insbesondere der Dosierung werden 100 biologische Einheiten als eine klinische Einheit angenommen, so daß das Vigantol, wenn auch mit großer Fehlergrenze, doch normiert werden kann.

Wir haben uns für den prophylaktischen Rattenversuch für weitere Untersuchungen entschlossen, da dieser nach einer 14tägigen Gesamtversuchszeit bereits bei der notwendigen Kritik sich ein Urteil zu bilden gestattet.

An Hand eines Versuches soll unser bisheriges Vorgehen im Rattenexperiment zur Bestimmung einer antirachitisch wirksamen Substanz dargestellt werden. Bei der folgenden Untersuchung galt es festzustellen, ob die Ergosterinester nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht antirachitisch wirksam werden. Ein Rattenwurf von 9 Tieren wurde so aufgeteilt, daß 1 Tier mit gemischter Kost ernährt wurde, während 8 Tiere auf McCollum-Kost Nr. 3143 gesetzt wurden. Eines davon blieb während der ganzen Versuchsdauer bei reiner Rachitiskost, den übrigen wurde nach 14tägiger reiner Rachitiskost neben der Diät die zu prüfende Substanz, in Olivenöl gelöst, zugefüttert. Die Tiere wurden in Drahtkäfigen in einem Raum gehalten, in dem direktes Sonnenlicht abgeblendet war. Für die Herstellung der Rachitiskost verwendeten wir die von *Holtz* angegebene Mischung der einzelnen Bestandteile in Gelatine, so daß ein schneidbares und gut durchmischtes Gel den Tieren verfüttert wurde. Außerdem bekamen die Tiere ausreichend destilliertes Wasser zu trinken. Nach 14 Tagen zeigte die röntgenologische Kontrolle bei den McCollum-Tieren deutliche Epiphysenrachitis am proximalen Tibiaende. Nach einer Gesamtversuchszeit von 4 Wochen, also nach weiteren 14 Tagen, wurde die röntgenologisch nachweisbare Epiphysenrachitis bei dem McCollum-Tiere noch deutlicher, und auch die Tiere, die 0,5 ccm einer 6 mg-proz. unbestrahlten oder bestrahlten Olivenöl-Digitoninlösung zugefüttert erhalten hatten, waren gleich schwer rachitisch. Die am gleichen Wurf ausgewertete Ergosterindigitonidlösung, die in einer täglichen Dosis von 0,5 ccm einer 8 mg-proz. Ergosterinlösung (= 0,04 mg Ergosterin) verabreicht wurde, beeinflußte unbestrahlt den Verlauf der Rachitis nicht, während die gleiche Menge bestrahlter Lösung wie aus der Abb. 6 auf S. 456 zu ersehen ist, antirachitisch wirksam war. Der Versuch zeigt deutlich, daß sich auch als

Ergosterindigitonid das Ergosterin antirachitisch aktivieren läßt. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, daß während der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht der Aktivierung eine Spaltung des Esters vorausgeht.

Therapeutischer Versuch über die antirachitische Wirkung von bestrahltem Ergosterindigitonid.

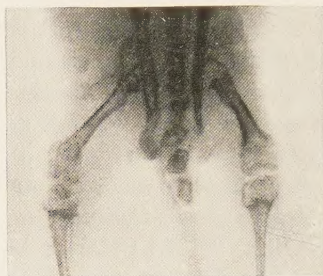


Abb. 1.
McCollum-Kontrolltier. Rachitis + + +.

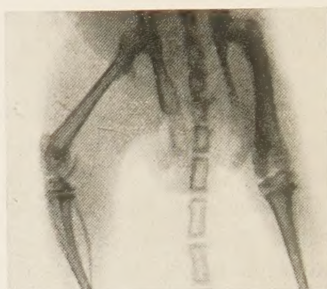


Abb. 2.
Gemischtkostkontrolltier. Rachitis ø.



Abb. 3.



Abb. 4.

Nach zweiwöchiger Verfütterung von täglich 0,5 ccm einer 6 mg-proz. Digitonidlösung.
Unbestrahlt. Rachitis + + +. Bestrahlt. Rachitis + + +.



Abb. 5.



Abb. 6.

Nach zweiwöchiger Verfütterung von täglich 0,5 ccm einer 8 mg-proz. Ergosterindigitonidlösung.
Unbestrahlt. Rachitis + + +. Bestrahlt. Rachitis fast ø.

Es ist allgemein bekannt, daß die experimentelle Rattenrachitis bei längerer Beobachtung zur spontanen Heilung kommt. Demgemäß ist zu fordern, daß der einzelne Rattenversuch nicht länger als 4 Wochen durchgeführt werden darf.

Auch in diesem mitgeteilten Versuch war bei allen Rachitistieren die Rachitis nach weiteren 14 Tagen — ohne Änderung der Kostform — in Heilung begriffen.

Wie wir hält *György* den Rattenversuch zur Auswertung einer antirachitisch wirksamen Substanz wegen der beschriebenen mannigfachen Schwierigkeiten noch nicht für restlos befriedigend. Nach *György* muß der Rattenversuch heute noch mit einer Fehlergrenze von 50% rechnen.

Der Vollständigkeit halber sei auch ein von *Warkany* vorgeschlagener Weg zur Bestimmung antirachitisch wirksamer Substanzen mitgeteilt. Er verfolgt bei gesunden Kaninchen nach oraler Verfütterung von großen Mengen bestrahlten Ergosterins zeitlich den Blut-P-Anstieg auf Natriumphosphatgaben. Während bei normalen Kaninchen 2 Stunden nach Verabreichung von Natriumphosphat sich der Phosphatspiegel des Blutes in 19 Versuchen nur durchschnittlich um 2,8 mg hebt, erreicht die phosphatämische Kurve nach gleichzeitiger Vigantolgabe regelmäßig höhere Werte. Die Versuchsanordnung vermag angeblich schon nach 24 Stunden bei normalen Kaninchen bestrahltes Ergosterin nachzuweisen.

2. *Chemische Versuche mit bestrahltem und unbestrahltem Ergosterin.*

Gegenwärtig wird der Wunsch immer dringender, den immerhin langwierigen und mit großer Fehlerbreite arbeitenden Rattenversuch zur Standardisierung antirachitisch wirksamer Substanzen für praktische und theoretische Fragen durch ein zeitlich kürzeres und genaueres Verfahren zu ersetzen.

Uns schwebte vor, auf chemische oder physikalische Weise schnell und eindeutig den von geringsten Einflüssen so abhängigen Gehalt an antirachitischer Kraft bestimmen und kontrollieren zu können. Da die Darstellung bestrahlten Ergosterins heute noch nicht gelungen ist, haben wir unsere Versuche meist auf die Ausgangssubstanz, auf das Ergosterin selbst, beschränkt und die vielfachen Untersuchungen an dem ihm chemisch verwandten Cholesterin uns zunutze gemacht. All diese Untersuchungen können jedoch nur als Vorversuche angesprochen werden, solange das aktive Prinzip nicht dargestellt werden kann. Sie bezwecken jedoch, einen Weg zur Beantwortung der gestellten Frage zu zeigen, welche Methoden neben dem biologischen Versuche sich überhaupt zum Nachweis des antirachitischen Prinzipes in und außerhalb des Organismus eignen dürften[1].

[1] Für diese Untersuchungen wurde uns in entgegenkommender Weise von der Chemischen Fabrik E. Merck in Darmstadt ihr für die Herstellung des Vigantols benutztes Ergosterin zur Verfügung gestellt. Dieses Ergosterin wurde von uns für einige Versuche teils in Lösung, teils in Substanz mit einer Quarzlampe verschieden lange bestrahlt.

Die wichtigsten Untersuchungen der letzten Jahre über Vorkommen, Konstitution und physiologische Wirksamkeit von Körpern aus der Gruppe der Sterine galten fast ausschließlich dem Cholesterin, dem Hauptvertreter der im tierischen Organismus vorhandenen Sterine. Die Sterine des Tier- und Pflanzenreichs sind bekanntlich verschieden; man hat die aus Pflanzen isolierten Sterine allgemein als Phytosterine bezeichnet und kennt im Sitosterin das verbreitetste Pflanzensterin, das nach *Windaus* und *Rahlén* ein stereomeres Cholesterin darstellen soll. In der Hefe findet sich vor allem das Ergosterin, das nur in minimalen Spuren auch den Sterinen der höheren Tiere und Pflanzen beigemengt ist. Nur dieses erwirbt nach Bestrahlung mit ultraviolettem Lichte antirachitische Wirksamkeit.

Das Cholesterin zeichnet sich durch besonders zahlreiche Farbenreaktionen aus, die zum Teil zu einer quantitativen Bestimmungsmethode ausgearbeitet werden konnten. Wir haben uns nun die Frage vorgelegt, wie weit diese Farbenreaktionen für das Cholesterin spezifisch sind bzw. wie sich Ergosterin und bestrahltes Ergosterin gegen Reagentien verhalten, mit denen Cholesterin typische Farbenreaktionen liefert.

1. Den Ausgang unserer Untersuchungen bildete die seit langem bekannte Salkowski-Reaktion, bei der die in Chloroform gelöste Substanz mit gleichen Teilen konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet wird. Die Gegenüberstellung von Cholesterin, Ergosterin und bestrahltem Ergosterin bietet folgendes Bild:

Anteil	Cholesterin	Ergosterin	Bestrahltes Ergosterin
Chloroform	purpurrot	farblos	grünlich-violett
Schwefelsäure	gelb	rotbraun ↓ abnehmend	rotgelb

Dabei spielen die quantitativen Verhältnisse nur für die Farbenintensität eine Rolle, nicht aber für den Farbton an sich. Zwischendurch auftretende Tönungen sind in allen Darstellungen weggeblieben, sofern sie sich nicht besonders charakteristisch erwiesen haben. Auf den sinnfälligen Unterschied im Verhalten von Cholesterin und Ergosterin hat auch *Windaus* hingewiesen. Über bestrahltes Ergosterin konnten wir bisher noch keine Angaben finden.

2. Eine nach *Liebermann-Burchard* modifizierte Probe, bei der wir die Substanz mit 5 ccm Chloroform, 5 Tropfen Essigsäureanhydrid und 5 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure versetzten, ließ in unseren Versuchen gleichfalls eine brauchbare Unterscheidung erkennen.

Cholesterin: Es tritt sofortige grüne Ringbildung an der Berührungs-

fläche der Flüssigkeiten auf; der zu Boden sinkende Schwefelsäureanteil ist gelb gefärbt.

Ergosterin: Auch hier grüne Ringbildung, aber tiefroter Bodensatz.

Bestrahltes Ergosterin: Wie beim Ergosterin grüne Ringbildung. Von 10 mg aufwärts ist zwischen dem organgeroten Bodensatz eine grünliche, milchig getrübte Zwischenschicht zu beobachten. Werden die einzelnen Proben stark durchmischt, dann bietet

Cholesterin: eine grasgrüne,
Ergosterin: eine grüngelbe, } Gesamtfärbung,
Bestrahltes Ergosterin: eine grünbraune

die beim bestrahlten Ergosterin von 10 mg aufwärts in Blau übergeht.

3. Einen ganz besonders feinen Cholesterinnachweis, der noch bei Lösungen von 1 : 80000 gelingt, gab *Tschugajeff* an. Zur Substanz werden 2 ccm Eisessig, 1 ccm Acetylchlorid und Spuren von Zinkchlorid gegeben. Nach 5 Minuten Kochen im Wasserbad fanden wir:

	3 mg	5 mg	10 mg
Cholesterin	rosa	dunkelrosa	rot
Ergosterin	gelb	braun	rotbraun
Bestrahltes Ergost.	gelb	braun	rotbraun

Die rosa bzw. gelbe Verfärbung zeigte intensive eosinartige Fluorescenz. Einen Unterschied zwischen bestrahltem und unbestrahltem Ergosterin konnten wir nicht nachweisen. Dagegen verhielten sich Ergosterin und Cholesterin auffallend different.

4. Auch bei der von *Weston* erstmals angeführten modifizierten Salkowski-Reaktion konnten wir keinen Unterschied zwischen bestrahltem und unbestrahltem Ergosterin erkennen. Die mit konzentrierter Schwefelsäure versetzte Chloroformlösung bleibt eine halbe Stunde im Dunkeln stehen und bekommt dann wiederum Chloroform zugesetzt. Bestrahltes und unbestrahltes Ergosterin fanden wir in ihrem Chloroformanteil klar durchsichtig, während das Cholesterin milchig getrübt erschien. Im übrigen bietet diese Methode keine wesentlichen Abweichungen von der Salkowskischen Reaktion.

5. Zur Bestimmung nach *Ekkert* gaben wir in Abweichung von der Originalangabe zu einer 2 mg enthaltenden alkoholischen Ergosterinlösung 10 Tropfen einer 1% alkoholischen Traubenzuckerlösung und 2 ccm konzentrierte Schwefelsäure. Dabei erhielten wir folgendes Bild:

Anteil	Cholesterin	Ergosterin	Bestrahltes Ergosterin
Alkohol	milchig trüb bläulich	grün	grün rötlich
Schwefelsäure . .	gelb	gelb ↓ farblos	gelb ↓ farblos

Der gelbe Ring an der Grenzfläche von alkoholischer Lösung und Schwefelsäure tritt bei Cholesterin nur in Konzentrationen über 10 mg auf. Das bestrahlte Ergosterin zeigt in der Farbtönung dem unbestrahlten gegenüber keine wesentlichen Unterschiede, dagegen aber in der Intensität der Farbe. Bei gleichen Versuchsmengen tritt die Farbbildung beim bestrahlten Ergosterin gegenüber dem unbestrahlten besonders auffallend hervor. Die einheitliche Farbe, die beim Umschütteln der Probe auftritt, ist für

Cholesterin: leichtviolett
Ergosterin: gelbbraun
Bestrahltes Ergosterin: tiefbraun
} mit starker Fluorescenz.

6. Mit einer 30proz. Lösung von Antimontrichlorid gibt Ergosterin nach *Wokes* bei einer 0,2proz. Konzentration über rot eine beständige Blauverfärbung. Unter 0,2% dagegen eine blaurote bzw. Purpurfarbe. Unser bestrahltes Ergosterin zeigte unmittelbar nach Mischung der Reagentien in allen Konzentrationen einen rotbraunen Ton, der nach längerem Stehen bei Mengen bis 5 mg der Substanz nach olivengrün, über 5 mg nach graublau umschlug. Vom Cholesterin sahen wir erst nach mehrstündigem Stehen in der Luft eine Veränderung der farblosen Lösung nach tiefviolett.

7. Worauf die Farbentwicklung beim aktivierten Ergosterin beruht, ist ebenso wenig geklärt, wie die Farbenbildung im allgemeinen und interessiert hier nur insofern, als sich bestimmte chemische Gruppen mit gemeinsamer Strukturanordnung auf gewisse Reagentien immer in gleicher Weise verhalten. Das hat *Steigmann* dazu geführt, für das bestrahlte Ergosterin einige Reaktionen anzugeben, die strukturchemisch den Aldehyden bzw. den ungesättigten Ketonen eigen sind.

Mit geringem Natriumhydrosulfitüberschuß entfärbte alkoholische Fuchsinlösung zeigt mit Aldehyden eine rotviolette bis violettblaue Farbe. In Substanz bestrahltes Ergosterin sammelt in diesem Reagens eine violette Farbe an seiner Oberfläche, was beim unbestrahlten nicht der Fall ist. Das in alkoholischer Lösung bestrahlte Ergosterin gibt bei der Fuchsinhydroschwefligsäurereaktion rotviolette Verfärbung. Diese Reaktionen sind, trotz der vielen Wiederholungen, die wir anstellten, nur selten einwandfrei für bestrahltes oder unbestrahltes Ergosterin auszuwerten gewesen. Wenn selbst mit gewissen Vorbehalten an eine qualitative Differenzierung gedacht werden kann, so versagt jede quantitative Bestimmungsmöglichkeit.

Auf der gleichen Voraussetzung wie die Fuchsinreaktion basiert die Silberoxydammoniumprobe. Beim Erwärmen des Reagens mit festem, bestrahltem Ergosterin soll kolloidales, gelbbraunes Silber reduziert werden. Diese Reaktion wurde von uns wie die nächste (8) nicht nachgeprüft.

8. Eine nach *Shaer* und *Kramer* für ungesättigte Ketone charakteristische Farbenreaktion konnte von *Sexton* mit bestrahltem Ergosterin erhalten werden. Anilinhydrochlorid mit Anilinüberschuß gibt beim Kochen mit ungesättigten Ketonen bzw. bestrahltem Ergosterin eine rote Farbe. Unbestrahltes Ergosterin zeigt nur leichte Trübung.

9. Bei unseren weiteren Untersuchungen über die Farbenbildung des bestrahlten Ergosterins konnten wir auch die Beobachtung von *Jendrassik* bestätigen, der beim Versuch der Jodzahlbestimmung vom bestrahlten Ergosterin ein unterschiedliches Verhalten von nativem und aktiviertem Ergosterin gegen eine Jodlösung in Tetrachlorkohlenstoff fand. In diesem Reagens wird Jod von Ergosterin entfärbt. Bestrahltes Ergosterin gibt eine violettorange Farbe, die bei 10stündiger Bestrahlung der verwendeten Substanz als Ausdruck der Zerstörung des aktiven Prinzips durch Überbestrahlung die reine Jodfarbe zeigt.

10. Als qualitativ einfachster Nachweis müßte wohl die von *Steigmann* angegebene irreversible Ausbleichung einer alkoholischen Methylenblaulösung 1 : 100000 bis 1 : 200000 durch an der Luft bestrahltes Ergosterin gelten. Nach unseren Erfahrungen lassen sich diese Befunde nicht bestätigen. Möglicherweise bestehen hier Zusammenhänge mit den Vorgängen, die *Windaus* bei der photochemischen Oxydation und Dehydrierung des Ergosterins beschrieben hat.

11. *Stoeltzner* wies in einer kurzen Notiz darauf hin, daß sich Phosphorpentoxyd schwarz färbt, wenn man es in Substanz mit Vigantol bzw. Lebertran zusammenbringt. Da Olivenöl mit und ohne Cholesterin dieses Verhalten nicht zeigt, bezeichnete *Stoeltzner* diese Reaktion als spezifisch für das Vitamin D. Wir konnten jedoch auch mit bestrahlter und unbestrahlter Milch, an Butter, Olivenöl das Auftreten der Schwarzfärbung von Phosphorpentoxyd beobachten und finden in einer Arbeit von *Christensen* unsere Erfahrungen dahin ergänzt, daß auch andere Vitamine und Hormone (aus Ovarien, Hoden, Pankreas) eine positive Phosphorpentoxydreaktion geben. *Forschner* und *Hottinger* haben diese Frage systematisch untersucht und fanden, daß alle *wasserfreien*, antirachitisch, optimal wirksamen Präparate mit Phosphorpentoxyd keine Schwarzfärbung liefern. Dagegen zeigen inaktive Sterine und Öle, Eiweißspaltprodukte, Kohlehydrate, organische Säuren, mehrbasische Alkohole die angeführte Reaktion. Die von Hormonen gegebene Schwarzfärbung ist nur in wässriger Lösung möglich und auch unspezifisch.

12. Vor kurzem berichteten *Häußler* und *Brauchli* über eine Ergosterinreaktion, die ursprünglich von *Tortelli* und *Jaffé* zum Nachweis von Lebertran in anderen tierischen oder pflanzlichen Ölen angegeben wurde. Die Vermutung, daß diese Farbenreaktion vom Ergosterinanteil im Lebertran gegeben wird, hat sich bestätigt, da nur reines Ergosterin wie zahlreiche Ergosterinderivate die gleiche Farbenreaktion

liefern. Auch bestrahltes Ergosterin gibt diese Reaktion, die jedoch in der Intensität der Farbbildung gegenüber nativem Ergosterin bei gleichen Konzentrationen zurückbleibt. Nach der Originalangabe wird zu der Substanz 10 ccm Chloroform, 1 ccm Eisessig und 2,5 ccm einer 10proz. Bromlösung in Chloroform gegeben, worauf sich beim Durchschütteln der Flüssigkeit innerhalb 5—10 Minuten ein grüner Farbton bildet.

13. Ergosterin gibt nach *Rosenheim* mit Chloralhydrat eine spezifische Farbenreaktion. Einige Ergosterinkrystalle, 1 mg oder weniger, werden mit ca. 0,5 g Chloralhydrat im warmen Wasserbad gelöst. Die Lösung wird sogleich carminrot, um nach einigen Minuten über Grün in ein dunkles Blau überzugehen. Nach Hinzufügen von Wasser verschwindet die Farbe, erscheint jedoch wieder, wenn ein Tropfen konzentrierter Salzsäure zugesetzt wird. Auch Trichloressigsäure liefert nur mit Ergosterin, wenn zu der in Chloroform gelösten Substanz 3 Tropfen einer 90proz. Trichloressigsäurelösung zugesetzt werden, über einen roten Zwischenton eine beständige blaue Farbe. Da von den untersuchten Sterinen nur die Allocholesterine und Allositosterine überhaupt bei diesen Reaktionen eine Farbbildung, die über Gelb nur bis zu einem Carminrot ging, zeigten, macht *Rosenheim* die Stellung der Doppelbindung im Sterinmolekül für diese Farbenreaktion verantwortlich.

14. Neben den in Analogie zum Cholesterin angegebenen Proben und den bereits bekannten Farbenreaktionen des Ergosterins bzw. bestrahlten Ergosterins, lieferte uns zum qualitativen Nachweis von nativem bzw. bestrahltem Ergosterin eine neue Reaktion besonders deutliche Unterschiede. In einer 0,15proz. Ergosterin- bzw. bestrahlten Ergosterinlösung in Chloroform zeigt sich bei der Zugabe der gleichen Menge konzentrierter Schwefelsäure beim bestrahlten Ergosterin eine sofortige rotbraune Ringbildung an der Berührungsfläche der Flüssigkeiten mit bodenwärts abnehmender Farbintensität; beim unbestrahlten Präparat fällt außer einer gelben Ringbildung nichts auf. Versetzt man diese Lösungen nun mit Äthylalkohol (in gleichen Mengen wie Chloroform), so zeigt die Trennungsfläche von Alkohol und Chloroform beim bestrahlten Ergosterin einen grünen Ring, der beim unbestrahlten Ergosterin fehlt. Nach mehrmaligem Umschütteln tritt wiederum eine Schichtenbildung auf, und zwar ist beim bestrahlten Ergosterin eine grünblaue Schicht von einer dunkelbraunen überlagert, wogegen das unbestrahlte Präparat eine gelbe obere Schicht und eine farblose Unterschicht, die nach längerem Stehen ins grünliche übergeht, zeigt. Höhere Ergosterinkonzentrationen — über 20 mg — haben eine intensiv grün gefärbte untere Farbenschicht, die von tiefviolettbrauner Farbe überlagert wird. Schematisch dargestellt, bietet diese Reaktion folgendes Bild:

1. Phase.

Anteil	Ergosterin	Bestrahltes Ergosterin
Chloroform	farblos	farblos
Schwefelsäure	gelb	rotbraun
	↓	↓
	farblos	farblos

2. Phase.

Anteil	Ergosterin	Bestrahltes Ergosterin
Alkohol	farblos	farblos
—		grün
Chloroform	farblos	farblos
—	gelb	rotbraun
Schwefelsäure	farblos	farblos

3. Phase. (Umgeschüttelt.)

Anteil	Ergosterin	Bestrahltes Ergosterin
Chloroform	gelb	dunkelbraun
Schwefelsäure	farblos	grünblau

Bei den Versuchen, eine *quantitative* Bestimmungsmethode des Ergosterins auszuarbeiten, gingen wir von der heute vielfach für die colorimetrische Bestimmung des Cholesterins angewandten Liebermann-Burchard-Probe in der von *Bloor* angegebenen Modifikation aus. Dabei ergab sich bei jeder Untersuchung der Lösungen, die nach der Originalvorschrift 2,7 mg% Cholesterin, und bei unseren Versuchen entsprechend 2,7 mg% Ergosterin enthielt, gegenüber der Standardlösung ein störender, gelber Farbton bei den zu prüfenden Konzentrationen, der eine exakte Bestimmung sehr erschwerte.

Da sich bei der Salkowski-Reaktion Chloroform und Schwefelsäure nicht mischen, benutzten wir zur quantitativen Bestimmung eine Reihenskala in Reagensgläsern. Im großen und ganzen entspricht wie beim Cholesterin die Konzentration der Ergosterinlösung der Farbintensität. Versucht man jedoch Ergosterin neben Cholesterin gleichzeitig auszuwerten, so treten in den Lösungen sehr schwer zu bestimmende Farbtönungen auf. Die nach *Salkowski* aufgestellte Reihenskala bot für eine Konzentration von 1—25 mg in 5 ccm Chloroform folgendes Bild:

Cholesterin: Unmittelbare Trübung in Chloroformanteil, von 5 mg aufwärts, rote Ringbildung an der Grenzfläche der Flüssigkeiten.

Ergosterin: Von 10 mg aufwärts, rotbraune Verfärbung im Säureanteil bodenwärts.

Nach 3stündigem Stehen im Dunkeln:

Cholesterin: Chloroformanteil rotviolett verfärbt, gegen die Schwefelsäure durch einen gelben Ring abgesetzt. Bei den Konzentrationen von 10 mg aufwärts, tiefrote Verfärbung.

Ergosterin: Von 5 mg an im Chloroform Grünfärbung. Das Chloroform ist stärker als beim Cholesterin durch eine getrübte Schicht nach oben abgegrenzt.

Beim Umschütteln nach 3 Stunden:

Substanzmenge in mg	1 2	3 4 5	10 20 25	
Cholesterin	violett grün	gelbbraun	braunrot	Chloroformanteil
Ergosterin	farblos	dunkelgrün	schmutziggrün m. violett	

Nach 6stündigem Stehen im Dunkeln:

Cholesterin: Chloroformanteil einheitlich rotviolett bis purpur, mit zunehmender Konzentration Steigerung der Farbintensität.

Ergosterin: Choroformanteil hat bis 5 mg seine Grünfärbung verloren und zeigt eine farblose Trübung; von 5 mg aufwärts bräunlich-rotviolette Farbe.

Beim weiteren Stehen ändert sich die Farbe nicht mehr.

Es bestehen also zweifelsohne bei den Farbenreaktionen der Sterine sichere Unterschiede zwischen Cholesterin und Ergosterin; und auch die Differenzen, die wir zwischen bestrahltem und unbestrahltem Ergosterin fanden, dürften für spätere Untersuchungen wertvoll sein. Allein es war uns klar, daß die Farbenbildung einer photochemisch veränderten Substanz praktisch noch nicht verwertbar ist, solange wir nicht in der Lage sind, eindeutige Konstanten anzugeben. Wir haben heute noch keinerlei Anhaltspunkte, welches Reaktionsprodukt des photochemisch umgesetzten Ergosterins wir als farbentypisch bezeichnen können. Die letzten Mitteilungen von *Smakula* und *Webster-Bourdillon* machen es sogar sehr unwahrscheinlich, daß die angeführten Farbenreaktionen dem antirachitischem Prinzipe zukommen. Denn die spektroskopischen Befunde dieser Forscher ergaben, daß das antirachitische Prinzip bereits nach wenigen Sekunden entsteht und mit zunehmender Bestrahlung wieder verändert und unwirksam wird. Daraus erhellt am besten, daß der gefundene Farbton die Reaktion von aktivem und bereits wieder verändertem, antirachitisch unwirksamen Ergosterin darstellen kann. Für die Gültigkeit unserer Befunde mit bestrahltem Ergosterin müssen wir den von uns gewählten Bestrahlungsmodus zugrunde legen. Das Merck-Ergosterin wurde je einmal aus Äther und Alkohol umkrystallisiert, in einem nicht evakuiertem Quarzgefäß als ätherische Lösung oder als Substanz eine halbe bis dreieinhalb Stunden mit einer Quecksilberlampe in 40 cm Abstand bestrahlt. Vor und nach der Bestrahlung wurde der Schmelzpunkt bestimmt; denn die Abnahme des Schmelzpunktes ließ uns eine Aktivierung des nativen Präparates annehmen. Über diese Tatsache werden wir weiter unten noch ausführlicher berichten.

Die bisherigen Versuchsergebnisse von *Windaus* und Mitarbeitern lassen auch die chemischen Reaktionen während der Bestrahlung reinen Ergosterins noch unaufgeklärt. Gesichert scheint heute jedoch, daß nur das Ergosterin aus der großen Reihe der bekannten Sterine und strukturchemisch ähnlich gebauten Substanzen trotz anfänglich gegensätzlicher

Befunde sich durch ultraviolette Bestrahlung antirachitisch aktivieren läßt. Von englischen Autoren wurden aus dem Hefefett, dem bestgeeigneten Ausgangsmaterial für die Ergosterindarstellung, die Sterine Zymasterol und Cervisterol isoliert, mit denen bisher entsprechend der Vermutung von *Windaus* trotz Bestrahlung mit ultraviolettem Licht keine antirachitische Wirksamkeit erzielt werden konnte.

Die chemischen Untersuchungsmöglichkeiten sind mit der Colorimetrie aber keineswegs erschöpft. Alle Sterine mit sterisch intakter Hydroxylgruppe gehen mit Digitonin eine Additionsverbindung ein. Von *Windaus* ist diese Digitoninfällbarkeit zu einer quantitativen Bestimmungsmethode für Cholesterin ausgearbeitet worden. Mit einer 1proz. alkoholischen Digitoninlösung läßt sich wie Cholesterin auch Ergosterin quantitativ fällen, während das bestrahlte Ergosterin nach *Beumer* seine Digitoninfällbarkeit verliert. Da das Ergosterin ein Digitonid bildet, das photochemische Reaktionsprodukt des Ergosterins aber nicht, muß ein kontinuierlicher Übergang bestehen zwischen vollständiger Fällung des nativen Ergosterins bis zur vollständigen *Aufhebung der Fällung des maximal aktivierten Präparates.* Erklären können wir uns diese Tatsache am besten durch eine sterische Umlagerung während der Bestrahlung an der sekundären Alkoholgruppe. Denn, wie gesagt, geben nur Sterine mit sterisch intakter Hydroxylgruppe im Gegensatz zu ihren Stereoisomeren eine Digitoninfällung, z. B. Koprosterin, β-Cholestanol u. a. Für den Verlust der Digitoninfällbarkeit des aktivierten Ergosterin macht *Smakula* das Verschwinden zweier Banden im spektroskopischen Bild verantwortlich, was der Auflösung einer Doppelbindung entsprechen soll.

In ähnlicher Weise wie die Abnahme der Digitoninfällbarkeit bei der Bestrahlung erfolgt eine Änderung der *optischen Drehung.* In den üblichen Lösungsmitteln, Alkohol, Äther, Benzin, Benzol, Essigester, Cyclohexan zeigt das Ergosterin Linksdrehung, die während der Bestrahlung langsam abnimmt und schließlich in eine schwache Rechtsdrehung übergeht (*Windaus-Linsert, Wagner-Jauregg, Jendrassik-Keményffi*). Mit der Rotationsänderung erfolgt eine Veränderung des ultravioletten Absorptionsspektrums und auffallende Zunahme der

Tabelle 1.

	Sp.	α	Proz. der Digitoniabnahme
Unbestrahltes Ergosterin:			
Wasserfrei	160,2°	—123°	—
Wasserhaltig	160,2°	—126°	—
30 Minuten bestrahlt	153,4°	—100°	7,6
60 Minuten bestrahlt	147,0°	— 93°	—
120 Minuten bestrahlt	137,0°	— 81,6°	31,4
600 Minuten bestrahlt	126,0°	unbestimmbar	fast 100

Löslichkeit. Gleichzeitig tritt auch eine stetige *Senkung des Schmelzpunktes* ein. Eine Zusammenfasssung dieser Befunde, die sich mit unseren Erfahrungen decken, gibt die von *Jendrassik-Keményffi* veröffentlichte Tabelle, die wir auf Seite 465 wiedergeben.

Da wir in Versuchen mit *Pasternak* nachweisen konnten, daß auch im Ergosterindigitonid der Ergosterinanteil quantitativ spektrophotometrisch bestimmt werden kann, war ein Weg für die Ergosterinbestimmung über die Darstellung von Digitonidgemischen gewiesen. Wir haben in einem Versuche A: 0,0114 g Ergosterin[1] mit 30 g Kalilauge, 30 ccm Wasser und 120 ccm Alkohol 4 Stunden geschüttelt und die farblose Flüssigkeit nach dem Schütteln mit 150 ccm Wasser versetzt (*Reindl* s. u.). In einem anderen Versuche B: behandelten wir ein Gemisch von 0,0114 g Ergosterin + 0,1141 g Cholesterin in der gleichen Weise. In beiden Versuchen trat Trübung und allmähliche Ausflockung auf. Nach 3maligem Ausäthern wurde der Ätherauszug gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft; die Rückstände werden dann in heißem Alkohol gelöst und auf 100 ccm aufgefüllt. Aliquote Teile fällten wir vor und nach einer Ultraviolettbestrahlung mit einer heißen 1proz. alkoholischen Digitoninlösung in geringem Überschuß. Die Abnahme der Digitoninfällbarkeit nach 12stündiger Bestrahlung geht aus folgendem Versuchsprotokoll hervor:

Tabelle 2. *Verlust der Digitoninfällbarkeit bestrahlter Ergosterinlösungen.*

	Ohne Cholesterin (Versuch A)[2]		Neben Cholesterin (Versuch B)[3]	
	Als Digitonid gewogen in g	Ergosterin in g	Als Digitonid gewogen in g	Ergosterin in g
Unbestrahlt	0,0456	0,0114	0,4933	0,0114
Bestrahlt	0,0013	0,0003	0,4622	0,0078
Verlust der Digitoninfällbarkeit	0,0443	0,0111	0,0311	0,0036

Die spektroskopische Prüfung der Niederschläge in Methanol gelöst ergab:

A unbestrahlt }
B unbestrahlt } deutliche Ergosterinabsorption
A bestrahlt keine Ergosterinabsorption.
B bestrahlt geringe Absorption.

[1] Aus dem Digitonid berechnet, da nur 84% des benutzten Ergosterinpräparates digitoninfällbar waren.

[2] Nach einer 12stündigen Bestrahlung mit ultraviolettem Licht einer vorher kalt verseiften Ergosterin-Lösung sind 97,15% Ergosterin nicht mehr digitoninfällbar.

[3] Nach einer 12stündigen Bestrahlung mit ultraviolettem Licht einer vorher kalt verseiften Mischung von Cholesterin mit Ergosterin sind 68,42% nicht mehr digitoninfällbar.

Während die reine Ergosterinlösung nach einer 12stündigen Bestrahlung mit einer Quecksilberquarzlampe fast vollständig (97,15%) seine Digitoninfällbarkeit verliert, erleidet die in gleicher Schichtdicke unter denselben Versuchsbedingungen bestrahlte Mischung von Cholesterin und Ergosterin in einem Verhältnis von 10 : 1 nur einen Verlust von 68,42%. Nach diesem Versuch scheint das Cholesterin eine hemmende Wirkung bei der Ergosterinaktivierung durch ultraviolette Strahlen auszuüben.

Der mitgeteilte Versuch bestätigt weiterhin die Möglichkeit, durch Digitoninfällung Ergosterin neben Cholesterin nachzuweisen. Das Verhältnis von Cholesterin zu Ergosterin in der gewählten Versuchsanordnung betrug 10 : 1. Die Abnahme der Digitoninfällbarkeit des Ergosterinanteils nach Bestrahlung geht bei der im Organismus geltenden durchschnittlichen Proportion Cholesterin zu Ergosterin wie 5000 : 1 weit über die Nachweismöglichkeit der Methode, die 1% Fehlergrenze hat, hinaus. Alle Bemühungen, das Ergosterin im Cholesterinmolekül anzureichern, blieben vorläufig noch erfolglos. Auch die Versuche von *Windaus* über die Umkristallisation aus Essigester, die Destillation im Hochvakuum oder die Rückgewinnung aus einem Kohleadsorbat zu konzentrierteren Ergosterinlösungen zu kommen, schlugen bisher vollkommen fehl.

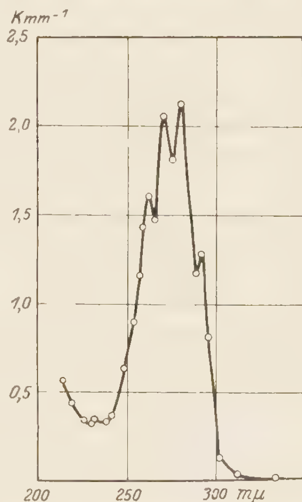


Abb. 7. Ergosterinabsorption im Ultraviolett. (Nach *Smakula*.)

3. Physikalische (optische) Messungsmethoden.

Im Gegensatz zum Cholesterin zeigt das Ergosterin nach den Untersuchungen von *Pohl* mit *Windaus* eine bestimmte Absorption im ultravioletten Licht, die zur Auffindung des Ergosterins als Verunreinigung des Handelscholesterins führte. Es gelingt auf photospektrometrischem Wege auch Ergosterinmengen im Verhältnis 10000 : 1 neben Cholesterin einwandfrei nachzuweisen.

Die in Abb. 7 wiedergegebene graphische Absorptionskurve des Ergosterins, wie die später folgenden Kurvenbilder stammen aus der Arbeit „Zur Kenntnis des Absorptionsspektrums vom Ergosterin in bestrahltem und unbestrahltem Zustande" von *Smakula*.

Ganz kurz sollen für das Verständnis der nachher gebrachten Bilder einige physikalische Anmerkungen über die Spektroskopie folgen, als deren wesentlichstes Ziel *Weigert* die Auffindung von Gesetzmäßigkeiten im Bau der Spektren und ihre Beziehungen zu den Anordnungen der Elektronen und Kerne in den Atomen und Molekülen bezeichnet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kann auf die *Voraussetzungen* und *Grundlagen* der spektroskopischen Absorptionsmessungen nicht näher eingegangen werden. Für eine quantitative Spektrophotometrie ist zur Anfertigung eines Absorptionsdiagrammes die Bestimmung des Absorptionskoeffizienten der zu untersuchenden Substanz bei verschiedenen, möglichst zahlreichen Wellenlängen notwendig. Der Absorptionskoeffizient drückt die Abnahme der Lichtintensität aus, die ein einfallender Lichtstrahl beim Durchtritt durch ein absorbierendes System erfährt. Die Abschwächung des Lichtes ist abhängig von der im Strahlengang befindlichen Substanzmenge, die durch das Produkt von Konzentration und Schichtdicke ausgedrückt wird. Bezeichnet man das einfallende Licht mit J_0, das hindurchgelassene Licht mit J, so ist $J = J_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot d}$, wobei ε den von der Konzentration unabhängigen Extinktionskoeffizienten, c die Konzentration und d die Schichtdicke darstellt. Aus der angegebenen Gleichung berechnet sich $\log \frac{J_0}{J} = \varepsilon \cdot c \cdot d$. Da der Absorptionskoeffizient $k = \varepsilon \cdot c$ ist, läßt sich durch Substitution in die vorhergehende Gleichung $k = \frac{1}{d} \cdot \log \frac{J_0}{J}$ ermitteln. Der Absorptionskoeffizient ist naturgemäß für jede Wellenlänge von verschiedener Größe. Bei der graphischen Darstellung der folgenden Absorptionskurven wurden der Absorptionskoeffizient auf der Ordinate, die Wellenlängen auf der Abszisse eingetragen. In der Abb. 7 ist das Spektrum des unbestrahlten Ergosterins mit seiner typischen Absorption zwischen den Wellenlängen 250—300 mμ wiedergegeben.

Bei der Aktivierung des Ergosterins durch ultraviolette Strahlen wird die Absorption zwischen 250—300 mμ fortschreitend aufgehoben, so daß am Schluß die für das unbestrahlte Ergosterin charakteristischen Absorptionen verschwinden.

Pohl hat bereits in einer seiner ersten Mitteilungen das Absorptionsspektrum des biologisch wirksamen, bestrahlten Ergosterins beschrieben und seine Unterscheidung gegenüber dem nativen Ergosterin dahin charakterisiert, daß die typischen Ergosterinabsorptionen verschwinden und dafür ein neues Maximum bei 247 mμ auftritt. Diese Beobachtung wurde von englischen Forschern (*Morton*, *Heilbronn* und *Kamm*) bestätigt. Diese Autoren haben außerdem auch die Spektren während der photochemischen Umsetzung verfolgt und die Werte für eine um vieles größere Bestrahlungsdauer als zum Verschwinden der Ergosterinbanden notwendig war, mitgeteilt. Diese übermäßig großen Bestrahlungszeiten heben die biologische Wirksamkeit des Ergosterins auf und zerstören das beschriebene Maximum bei 247 mμ. Ursächlich werden für die Aufhebung der antirachitischen Wirkung bei Überbestrahlung anderer Wellenlängen

wie die für die Ergosterinaktivierung in Frage kommenden verantwortlich gemacht. Diese zerstören nachträglich das anfangs gebildete antirachitische Prinzip. werden also spektroskopisch in den Hauptbanden des unveränderten Ergosterins absorbiert. Um diese Frage entscheiden zu können, hat *Smakula* die Beeinflussung der Absorptionsspektra durch Lösungsmittel, Sauerstoff, zeitliche Lagerung (s. Abb. 8, 9 und 10) usw. untersucht und sie für die Bewertung der mitgeteilten Befunde der englischen Autoren als grundlegend bedeutungsvoll gefunden.

Das unbestrahlte Ergosterin zeigt bisher 5 beschriebene und bestätigte Maxima bei 23 Beobachtungswellen, und zwar bei 232, 262 (*Smakula*, *Bills* und *Honeywell*), 270, 280, 293 mμ (*Pohl*, *Morton*, *Heilbronn*, *Kamm*). Diese Maxima werden bei der Umwandlung in das antirachitische Prinzip durch andere ersetzt bzw. vollständig aufgehoben. Ein flüchtiger Blick auf das Kurvendiagramm läßt schon erkennen, daß die Veränderungen nicht von Anfang bis Ende gleich verlaufen, sondern daß eine Reihe aufeinanderfolgender Einzelreaktionen bei der photo-chemischen Umsetzung zum aktivierten Ergosterin führen. Darin finden wir auch die Erklärung, warum es bisher nicht gelungen ist, das Kristallisationsprodukt mit der antirachitischen Wirksamkeit zu fassen, um das sich *Windaus* und viele andere so sehr bemühen. Das Wesentlichste, das bei der beginnenden Umwandlung im Spektrum imponiert, ist der Anstieg der Absorption im Gebiet der kürzeren Wellen und der Verlust der Hauptabsorptionsbanden mit Ausnahme der beiden bei 293 und 262 mμ. Im Tierversuch ergab ein nur wenige Sekunden bestrahltes Ergosterinpräparat (mit den Maxima bei 293 und 262 mμ) vollwertige antirachitische Wirksamkeit. Nach *Smakula* ist möglicherweise das antirachitische Prinzip mit einer Substanz identisch, die sich spektroskopisch durch das Fehlen der Maxima bei 270 und 280 mμ vom Ergosterin unterscheidet und damit vielleicht nur ein intramolekular

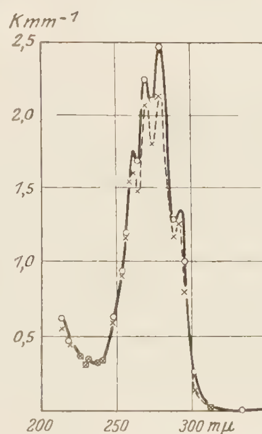


Abb. 8.
o Präparat frisch.
× Präparat 5 Mon. alt.

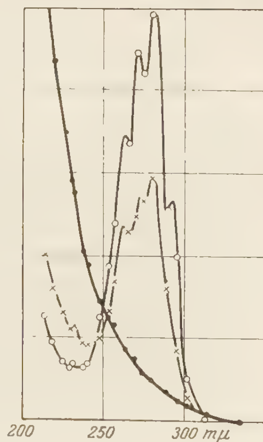


Abb. 9.
o Präp. frisch. × Präp. 2 Mon. alt. ● Präp. 5 Mon. alt.

Abb. 8 und 9. Abhängigkeit des Ergosterinspektrums von zeitlicher Lagerung und Zustand (kristallisiert Abb. 8, in Lösung Abb. 9.) Nach *Smakula*.

verändertes Ergosterin darstellt. Wenn *Smakula* das erste Reaktionsprodukt des bestrahlten Ergosterins als einen Körper bezeichnet, der zwischen 250 und 320 mμ noch Absorptionsbanden besitzt, so geschieht das deshalb, weil mit Recht die Möglichkeit offen bleibt, daß sich auch diese Substanz als komplex erweist. Bei einer Bestrahlungsdauer über

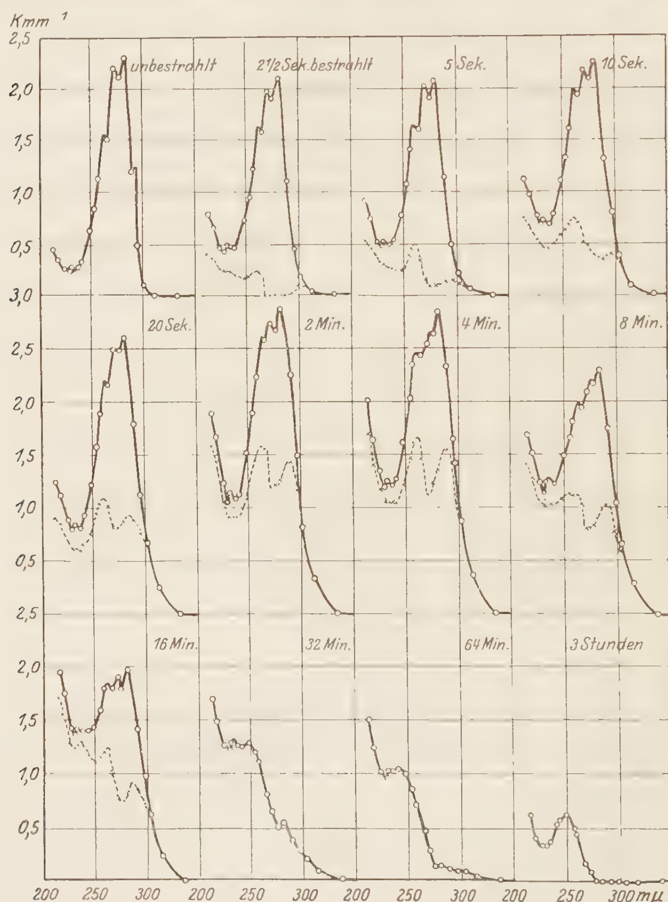


Abb. 10. Die Abhängigkeit des Absorptionsspektrums von der Bestrahlungsdauer und das Spektrum des ersten photochemischen Produktes. Nach *Smakula.*

15 Minuten verlieren sich allmählich auch die Maxima bei 293 und 262 mμ. Zu der bestehenden Bande bei 232 tritt eine neue bei 247 mμ, die von *Pohl* sowie auch von *Heilbronn* und *Kamm* als typisch für das antirachitische Prinzip bereits beschrieben wurde. *Rosenheim* hat als erster gegen diesen Befund seine Bedenken geäußert. Nach den letzten Ergebnissen steht es fest, daß bisher die Bestrahlung nie solange durch-

geführt wurde, bis die Absorption im Ergosteringebiet vollständig aufgehoben war. Die Absorption zwischen 270 und 300 mμ hatte man einem Rest nicht aktivierten Ergosterins zugeschrieben. Da nun aber feststeht, daß das erste antirachitisch wirksame Reaktionsprodukt in demselben Spektralgebiet absorbiert wie das gewöhnliche Ergosterin, ist man nicht mehr zu der erwähnten Annahme berechtigt. *Webster-Bourdillon* versuchten der Analyse des bestrahlten Ergosterins noch auf anderem Wege näher zu kommen, indem sie die jeweils verschieden lang bestrahlten Lösungen mit Digitonin fällten und damit den noch nicht veränderten Ergosterinanteil ausschalten zu können glaubten. Die verschiedenen spektrographischen Kurven zeigten außer einem Maximum bei 280 mμ keinerlei übereinstimmende Bilder. Im Gegensatz zu den deutschen Forschern schreiben *Webster-Bourdillon* sowie *Fischmann* und *Jenkins* dem Maximum bei 280 mμ die antirachitische Heilwirkung zu.

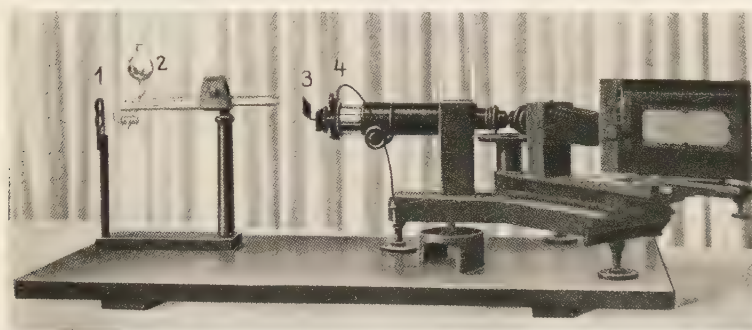


Abb. 11. Absorptionsspektrograph mit photographischer Kamera. (Die Lichtquelle ist links vom Balyrohr zu denken.)

Zusammenfassend läßt sich auch an dieser Stelle auf die großen Schwierigkeiten hinweisen, die der spektrophotometrisch verfolgte Aktivierungsvorgang am Ergosterin bietet. Sicherlich werden sich aber die heute noch widersprechenden Meinungen über die Charakteristik des Absorptionsspektrums vom antirachitisch vollwertig wirksamen Prinzip zu einer einheitlichen Auffassung durchsetzen, wenn eine allgemein anerkannte weitere Normierung des wirksamen Prinzips möglich geworden ist. Aus diesem Grunde dürfte diese optische Bestimmungsmethode als eine rasch und sicher arbeitende Nachweismöglichkeit für die Zukunft von größter Bedeutung sein. Eine quantitative Ergosterinbestimmung ist durch das beschriebene optische Verfahren heute schon möglich. Es läßt sich durch vergleichende Untersuchungen mit bekannten Lösungen aus einem Photogramm der Ergosteringehalt bestimmen.

Mit einem in der Abb. 11 wiedergegebenen Spektrographen, der uns von der Firma Steinheil & Söhne, München, zur Verfügung gestellt

wurde, haben wir die Absorption einer Ergosterinlösung bei verschiedenen Konzentrationen und Schichtdicken bestimmt. Das von einem Quarzbrenner ausgehende Licht wurde durch 2 Kondensatorlinsen, die (1) vor ein Balyrohr (2) geschaltet waren, geteilt, so daß unter das Absorptionsspektrum der Lösung ein Kontrollbild der Lichtquelle ent-

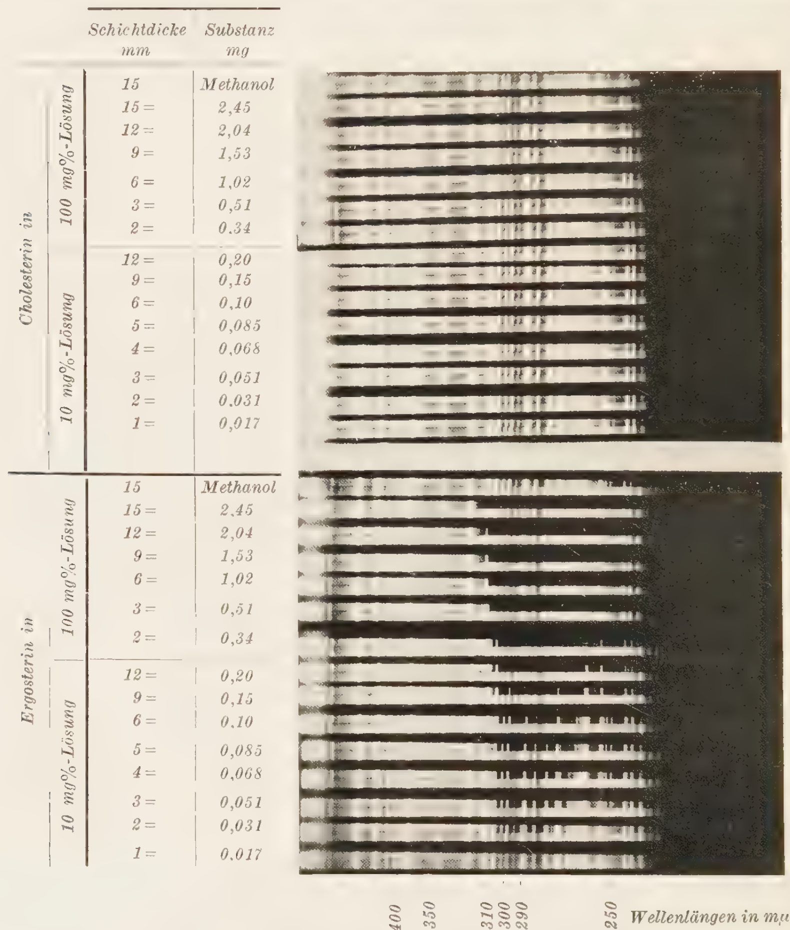


Abb. 12. Abhängigkeit des Ergosterinspektrums von der Substanzmenge.

worfen wurde. Das Balyrohr gestattete durch einen aufgesetzten Behälter, in den die zu untersuchende Flüssigkeit gedrückt werden konnte, bequeme Untersuchungen bei verschiedenen Schichtdicken. Ein vor dem Objektiv des Spektrographen befestigtes Prisma in Form eines Parallelepipedon (3) führte das obere Lichtbündel in den Spalt. Im Kollimator (4) des Spektrographen war ein photographischer Verschluß eingebaut.

In der Abb. 12 ist das Ergebnis einer Ergosterinbestimmung für verschiedene Schichtdicken und Konzentrationen zusammengestellt. Die Ergosterinausbleichung kommt vor allem bei den mittleren Konzentrationen besonders deutlich zum Ausdruck, während bei den stärkeren Konzentrationen eine Endabsorption auftritt. Die kleinstgewählte Schichtdicke mit entsprechend geringem Ergosteringehalt ist wie die zum Vergleiche mit aufgenommenen verschiedenen Cholesterinkonzentrationen wieder vollkommen durchlässig.

4. *Ergosterinbestimmung in Cholesterinen aus verschiedenen menschlichen Organen.*

Nach den vorausgegangenen Ausführungen ist es mit Hilfe der Spektrophotometrie heute möglich, Ergosterin selbst in kleinsten Mengen nachzuweisen. Dadurch wurden wir veranlaßt, menschliche Organe auf ihren Ergosteringehalt zu untersuchen. Das Ergebnis mußte schon deshalb von allgemeinem Interesse sein, weil so der gesamte Fragenkomplex der direkten Körperbestrahlung von neuen Gesichtspunkten aus behandelt werden kann. Bekanntlich dringen bei direkter Bestrahlung die ultravioletten Strahlen nur bis zur Oberfläche des Hautcapillarnetzes vor. Wenn eine biologische Wirksamkeit der ultravioletten Strahlen auf den Gesamtkörper erzielt werden kann, so ist das nur in der Weise denkbar, daß eine in der Haut vorhandene Substanz eine photochemische Umsetzung im Sinne einer Aufladung mit antirachitisch wirksamem Prinzip erfährt. Das in der Haut aktivierte Ergosterin wird dann in seiner biologisch wirksam gemachten Form an die entsprechenden Angriffsstellen im Körper transportiert. Die *Falkenheim*schen Verfütterungsversuche mit bestrahlter Haut weisen in diese Richtung. Doch konnte unseres Wissens bisher das Vorkommen von Ergosterin in der Haut noch nicht belegt werden. *Küster* und *Dejust* glauben, daß ihnen der Ergosterinnachweis im Blut gelungen ist. Jedoch bedürfen diese Versuche wegen methodischer Schwierigkeiten einer kritischen Nachprüfung. Im Verlaufe größerer Untersuchungsreihen haben wir in verschiedenen Organen Ergosterin nachzuweisen versucht.

Da die direkte Ergosterindarstellung aus Organen wegen der gleichen Löslichkeitsverhältnisse wie Cholesterin nicht möglich ist, wurde für die folgenden Untersuchungen wie bei einer Cholesterindarstellung vorgegangen. Es mußte hier mit Lösungen von kristallisierten Präparaten gearbeitet werden, um die durch Beimengungen verursachten störenden Absorptionen auszuschalten. Während der Aufarbeitung der Substanzen wird die Ergosterinkonzentration in der Cholesterinfraktion nicht verändert. Das durchschnittliche Verhältnis von Cholesterin zu Ergosterin mit 5000 : 1 veranlaßte uns mit der Aufarbeitung cholesterinreicher

Organe zu beginnen. Damit waren die Aussichten einer relativ günstigen Ergosterinausbeute gegeben[1].

Bei der Darstellung des Cholesterins lehnten wir uns an die von *Reindl* angegebene Methode der Ergosteringewinnung aus Hefefett an. Das zu untersuchende Organ wurde mit kalter alkoholischer Kalilauge 4 Stunden geschüttelt und die Lösung nach Zugabe von Wasser 3mal mit Äther extrahiert; der Ätherauszug wurde über Natriumsulfat getrocknet und darauf der Äther weitmöglichst abdestilliert. Gewöhnlich kristallisierte daraus nach kurzer Zeit eine gelbliche Substanz aus, die umkristallisiert und auf ihre physikalischen Konstanten geprüft wurde.

Die Aufarbeitung der einzelnen Organe bot erwartungsgemäß nicht immer das gleiche Bild. So zeigt das Gehirn von Neugeborenen und Kindern gegenüber dem des Erwachsenen in der Farbe des Ätherauszuges eine deutliche Verschiedenheit. Der Extrakt aus Kindergehirnen ist fast regelmäßig farblos, der von Erwachsenen gelbgrün. Beim Einengen des Äthers nimmt die Intensität der Farbe zu, was für die spätere Reinigung von Bedeutung ist. Die Kristallmasse aus Neugeborenen und Kindergehirnen kann nach 2—3maligem Umkristallisieren aus heißem Alkohol als chemisch rein angesprochen werden.

Die Sterinfraktion aus Leber und Nieren, die einen besonders intensiv gefärbtes Extrakt ergeben, haben wir mit Aceton nachgewaschen. Nach mehrmaligem Umkristallisieren konnten wir aber nur aus den Nieren ein chemisch reines Cholesterin darstellen. Sehr erschwerend erwies sich bei der Aufarbeitung der Organextrakte bisweilen das Verhalten des Äthers gegenüber der angrenzenden alkoholischen bzw. wässerigen Flüssigkeitsschicht. Es tritt nämlich nur selten eine scharfe Trennung der beiden Flüssigkeiten an ihren Berührungsflächen auf, weit häufiger bildet eine gallertartige Zwischenschicht den Übergang von einer in die andere Flüssigkeit. Dadurch wird ein einwandfreies Arbeiten außerordentlich erschwert, wenn nicht ganz unmöglich gemacht. (In einer Arbeit von *Kappel*, *Liesegang* und *Mastbaum* fanden wir diese Befunde bestätigt.) Es empfiehlt sich daher, starkes Schütteln zu vermeiden.

Aus der Tab. 3 sind alle näheren Daten unserer Versuche über den Ergosteringehalt verschiedener Organ-Cholesterine zu ersehen. Die bisherigen Ergosterinbestimmungen sollen an größerem Material erweitert werden. Die höchste Ergosterinkonzentration fanden wir in einem

[1] Herr Privatdozent Dr. *Laquer* (I. G. Farbenindustrie, Werk Elberfeld) hatte die Freundlichkeit, in den von uns aus verschiedenen Organen dargestellten Cholesterinen die minimalen Ergosterinbeimengungen spektrophotometrisch zu bestimmen.

Inzwischen ist uns der Ergosterinnachweis im Cholesterin der Haut mit gleicher Methodik gelungen. Die Versuchsergebnisse werden demnächst veröffentlicht.

aus dem Gehirn eines Neugeborenen dargestellten Cholesterin. Mit zunehmendem Alter scheint die Ergosterinkonzentration des Hirncholesterins geringer zu werden. Im Erwachsenengehirn konnte trotz der Feinheit der optischen Methode wiederholt kein Ergosterin nachgewiesen werden. Im Gehirn von Rachitikern, von denen einer spasmophile Symptome bot, zeigte bei einer Konzentration von Cholesterin zu Ergosterin mit 5000 : 1 bzw. 3600 : 1 reichliche Ergosterinmengen. Auch das aus Nieren gewonnene Cholesterin enthielt Ergosterin, dessen Gehalt gerade an der Nachweisgrenze des Ergosterins im Cholesterin liegt. Aus der letzten Reihe der Tabelle ist der Ergosteringehalt von Gallensteinen zu ersehen, die erst 1 g Ergosterin in 4 kg Cholesterin enthalten. Durch weitere systematische Untersuchungen sollen größere Zahlenreihen gewonnen werden. Nach den bisherigen Befunden sind wichtige Ergebnisse zu erhoffen.

Tabelle 3. *Versuchsergebnisse. Ergosteringehalt von Cholesterinen.*

Organ	Herkunft	Todesursache	Feuchtgewicht in g	Trockensubstanz		Cholesterin. Gewonn. Subst.-Menge in g	Cholesteringehalt d. Feuchtsubstanz i. Proz.	Ergosteringeh. d. Cholesterins in Proz.	Verhältnis von Cholesterin zu Ergosterin	Phosphorgehalt	Schmelzpunkt unkorr. ° C.	*Salkowski*-Reaktion
				Gewicht in g	in Proz.							
Gehirn . . .	eines Neugeboren. 1	Geburtstrauma	464	56,0	12,0	2,0750	0,447	0,033	3000 : 1	ø	145	+
„ . . .	„ Neugeboren. 2	Geb.-Atelektase	383	42,5	11,1	1,3590	0,358	0,085	1200 : 1	ø	146	+
„ [1] . . .	„ 3 monatlich. ♀	Dystrophie	572	78,7	13,7	3,6200	0,632	0,033	3000 : 1	ø	146	+
„ [2] . . .	„ 4 monatlich. ♂	alim. Intoxikat.	420	59,5	14,1	3,2430	0,772	0,021	5000 : 1	ø	146,5	+
„ [3] . . .	„ 6 monatlich. ♀	Grippe(Pneum.)	770	77,0	10,0	2,9276	0,380	0,028	3600 : 1	ø	145	+
„ . . .	„ 59 jährigen ♂	Pneumonie	1309	394,7	30,0	17,2190	1,315	ø	ø	ø	146	+
„ . . .	„ 45 jährigen ♂	Lungenembolie	1518	310,0	21,0	11,1624	0,736	ø	ø	ø	145,5	+
Nieren . . .	von verschiedenen	—	705	138,0	19,5	0,7500	0,109	0,010	10 000 : 1	ø	142,5	+
Gallensteine	von Leichen	—	100	100,0	100,0	74,7000	74,700	0,024	4000 : 1	ø	145	+

[1] Floride Rachitis. [2] Rachitis + Spasmophilie. [3] Substanzverlust durch Siedeversuch.

Die Organe wurden spätestens nach 2 mal 24 Stunden verarbeitet. Die angegebenen Ergosterinwerte sind auf ± 8% genau. Die von uns aus Leber gewonnenen Cholesterinpräparate konnten wegen einer im ultravioletten Spektrum stark absorbierenden Verunreinigung auf ihren Ergosteringehalt noch nicht geprüft werden.

5. Anhang. Nachweis des antirachitischen Prinzips durch klinische Methoden.

Die für die Rachitisforschung so bedeutende

Erkenntnis, daß eine chemisch einheitliche Substanz in kleinsten Mengen nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht antirachitische Wirksamkeit erlangt, war das glänzende Ergebnis unzähliger experimenteller Laboratoriumsversuche, die mit größter Umsicht in systematischer Arbeit durchgeführt wurden. Die im Tierexperiment gewonnenen Erfahrungen ließen sich auch bei der Spontanrachitis am Krankenbette voll bestätigen und haben die Möglichkeit einer höchst wirksamen Rachitistherapie und einer umfassenden Prophylaxe geschaffen.

Ganz kurz soll auf die Nachweismethoden bei der Rachitisheilung des Kindes eingegangen werden, obgleich sie nur für klinische Beobachtungen, nicht aber für praktische Zwecke Bedeutung gewinnen.

Die Rachitis ist eine Allgemeinerkrankung, deren sinnfälligste Störung sich am Skelettsystem äußert. Ursache der Skelettveränderung ist eine Störung im Mineralhaushalt, die mit Ausnahme weniger, anders gelegener Rachitisfälle durch den Mangel an ultraviolettem Licht ausgelöst wird. Für die Beurteilung eines Heilerfolges am Krankenbett ist vor allem *die Besserung des Gesamtbildes ausschlaggebend*, die objektiv in veränderter Beschaffenheit und Leistung der Organe und Gewebe, besonders wiedergewonnener Resistenz, dann vermehrter Bewegungsmöglichkeit und besserer Stimmungslage des Kindes, neben vielen anderen Zeichen, zum Ausdruck kommt. Die Heilung der rachitischen Ossificationsstörung läßt sich durch Serienröntgenogramme einigermaßen festlegen. Ergänzt wird diese Untersuchungsmethode zweckmäßig durch eine serologische Prüfung. Nachdem *Iversen* als Ausdruck der Störung im Mineralhaushalt bei der Rachitis eine Erniedrigung des Phosphorgehaltes im Blutserum beschrieben hatte, konnte durch *Howland* und *Cramer* diese Hypophosphatämie an einem großen Rachitismaterial bestätigt und als ein allgemein gültiger Befund nachgewiesen werden. Beim Kinde beträgt der anorganische Phosphorgehalt in 100 ccm Serum erstaunlich konstant 4,5—5 mg P. Bei der Rachitis können die Werte bis herunter zu 1 mg, ziemlich parallel der Schwere der Erkrankung gesunken sein. Die Heilung der Rachitis dokumentiert sich durch einen stetigen Anstieg des P-Wertes zum Normalwert. Falls besonders wirksame antirachitische Therapie betrieben wurde, kann dieser auch weit überschritten werden.

Neben diesen einfach durchführbaren Bestimmungen der Rachitisheilung am Krankenbett stehen eine Reihe weiterer Untersuchungsmöglichkeiten zur Verfügung, die eine Regulierung anderer, bei der Rachitis gestörter Stoffwechselfunktionen nachweisen lassen. *Freudenberg* und *Welker* konnten zeigen, daß bei der floriden Rachitis eine Störung des Kohlehydratstoffwechsels nachweisbar ist. Während im Blut des gesunden Kindes in vitro der Blutzucker allmählich verschwindet, fehlt diese Glykolyse im Blute des rachitischen Kindes. Nach den Untersuchungen von *Hentschel* nimmt die Glykolysefähigkeit langsamer als

der P-Anstieg im Serum nach Vigantolgaben als Ausdruck der Rachitisheilung wieder zu. Obgleich nach den Untersuchungen von *Hentschel* der Verlust der Glykose nicht rachitospezifisch ist, sondern auch bei weiteren krankhaften Zuständen nachgewiesen werden kann, läßt sich auch auf diesem Wege der Stand der Rachitisheilung während einer Therapie objektiv verfolgen.

Die Aufhebung der Glykolysefähigkeit des Blutes soll nach den Arbeiten von *Hentschel* und *Zoeller* auf der Unmöglichkeit, den Zucker mit Phosphor zu verestern, beruhen, da der Blutzucker nur als Hexosephosphorsäure abgebaut werden kann. Diese Störung in der Phosphoryllierung des Zuckers bei der Rachitis läßt sich auch dadurch belegen, daß bei einer Zuckerbelastung (*König* und *Lenart*) nach oralen oder intravenösen Zuckergaben die Blutzuckerkurve höher ansteigt und der folgende Zuckerabbau über 4 Stunden, gegenüber einer Stunde im normalen Organismus, verzögert ist. Während einer Rachitisheilung nähert sich die Kurve für den zeitlichen Ablauf der Blutzuckererhöhung nach Zuckerbelastung fortschreitend der Norm.

Die bei der Rachitis herrschende Acidoseneigung, auf deren experimentellen Nachweis und Bedeutung (siehe *Ullrich*) nicht näher eingegangen werden soll, führt zu einer Steigerung der Ausscheidung von Phosphor durch Harn und Kot, die auch für das Ca nachweisbar ist. Bei heilender Rachitis wird die Bilanz des Mineralstoffwechsels durch die Herabsetzung der Salzausscheidungen schließlich wieder positiv. Nach *Heymann* scheidet der Rachitiker oral und parenteral zugeführtes Natriumphosphat innerhalb einiger Stunden wieder aus, während das gesunde Kind wie der heilende Rachitiker 50% im Durchschnitt retiniert. Nach intravenöser wie oraler Zufuhr von Natriumphosphat kann der P-Spiegel im Blute des normalen Kindes auf unnatürlich hohe Werte gesteigert werden, während diese phosphatämische Kurve beim Rachitiker nur eine eben nachweisbare Erhebung des P-Spiegels zeigt. Nach 1maliger Zufuhr des wirksamen antirachitischen Prinzips bleibt die sonst schnell einsetzende P-Ausscheidung bei Phosphatbelastung aus. Das Verfolgen der phosphatämischen Kurve wird von *Warkany* als Nachweismethode antirachitisch wirksamer Substanzen empfohlen. (Die Möglichkeit, auch beim Kaninchen das antirachitisch wirksame Prinzip nach dieser Methode nachzuweisen, wurde bereits erwähnt.) Nach *Hottinger* werden bei florider Rachitis auch vermehrt organische Säuren neben Ca und P mit dem Harn ausgeschieden. Beim Heilungsvorgang der Rachitis nimmt der Gehalt des Harnes an organischen Säuren ab und erreicht wieder normale Werte. Auch hierdurch kann der Erfolg einer antirachitischen Therapie nachgewiesen werden.

Wir sind uns bewußt, mit dieser Darstellung nicht einen lückenlosen Zusammenhang der Nachweismöglichkeiten über die Wirkung des anti-

rachitischen Prinzipes am Menschen gegeben zu haben. Sie scheinen uns jedoch die heute meist gesicherten zu sein. Deshalb haben wir von einer Wiedergabe anderer Befunde im Rahmen dieser Arbeit Abstand genommen.

Zusammenfassung.

Die wichtigste Erkenntnis der neueren Rachitisforschung bildet die Aufdeckung des antirachitischen Faktors als das durch die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht aktivierte Ergosterin. Dieser in kleinsten Mengen antirachitisch wirksame Stoff stellt das übergeordnete Prinzip der bisher widerspruchsvoll erschienenen klimatischen, physikalischen, diätetischen und medikamentösen Einflüsse auf die Rachitis dar.

Dieses antirachitische Prinzip läßt sich nur mit großer Fehlerbreite im Rattenversuch für praktische Zwecke standardisieren. Da der Tierversuch sich ferner über einen Zeitraum von 14 Tagen erstreckt, sollten diese Mängel des biologischen Nachweises durch ein zeitlich kürzeres Verfahren ersetzt werden. Hierfür schien eine chemische Reaktion oder eine physikalische Meßmethode am geeignetsten.

Da das antirachitische Prinzip sich bis heute noch nicht durch einwandfreie Konstanten charakterisieren läßt, müssen die in vorliegender Arbeit vornehmlich an seiner Vorstufe, dem inaktiven Ergosterin durchgeführten Untersuchungen, nur als Vorversuche angesprochen werden. Das Ergosterin kommt in der Natur meist in Verbindung mit Cholesterin vor und gibt wie dieses eine Reihe von Farbenreaktionen, die es deutlich vom Cholesterin unterscheiden lassen, jedoch in einem Gemisch von Ergosterin mit Cholesterin undefinierbar und nicht quantitativ zu verwerten sind. Das gleiche gilt für das bestrahlte Ergosterin, das sich jedoch in reinen Lösungen durch eine Reihe von Farbenreaktionen vom nativen Ergosterin unterscheidet. Die quantitative Bestimmung des durch ultraviolette Bestrahlung antirachitisch wirksam gewordenen Ergosterins durch Verlust der Digitoninfällbarkeit, Änderung der optischen Drehung und Abnahme des Schmelzpunktes läßt sich heute noch nicht für Standardisierungszwecke zu einer quantitativen Methode ausarbeiten, da diese Veränderungen nicht der antirachitischen Leistung parallel gehen. Bei Ergosterin-Cholesteringemischen aus natürlich vorkommenden Präparaten stört auch hier der Hauptanteil des Cholesterins. Physikalisch läßt sich durch die Absorptionsmessung das Ergosterin quantitativ bestimmen. Das für das antirachitische Prinzip kein einheitliches optisches Merkmal bekannt ist, ist die quantitative Bestimmung des antirachitischen Prinzipes auf diesem Wege noch nicht möglich.

Mit Hilfe der Photometrie gelang der Nachweis von Ergosterin in menschlichen Gehirnen, Nieren und Gallensteinen. Der Ergosteringehalt im Cholesterin aus Neugeborenengehirnen war am größten. Das aus Säuglingsgehirnen dargestellte Cholesterin enthielt nachweisbar weniger

Ergosterin. Im großen und ganzen stimmte der Ergosteringehalt dieser Cholesterine mit dem aus dem Gehirn eines Rachitikers sowie eines Spasmophilen dargestellten Cholesterin, soweit die bisherigen Ergebnisse einen Schluß erlauben, überein. Im Cholesterin aus Erwachsenengehirn ließ sich kein Ergosterin nachweisen. Niere und Gallensteine sind, wenn auch in geringem Maße, ergosterinhaltig.

Kurz werden zum Schlusse die klinischen Methoden für den Nachweis einer antirachitisch wirksamen Substanz besprochen und durch neue Nachweismöglichkeiten ergänzt.

Literaturverzeichnis.

Adam, Jb. Kinderheilk. **113**, 3; Folge-Bd. **62**, H. 1/2, 61 (1926). — *Adam* Klin. Wschr. **38** (1928). — *Adams-McCollum*, J. of biol. Chem. **78**, 495 (1928). — *Burger-Osman*, Lancet **206** (1924). — *Beumer-Falkenheim*, Klin. Wschr. **17** (1927). — *Beumer*, Klin. Wschr. **20** (1927). — *Bills-Honeywell*, J. of biol. Chem. **76**, 251 (1928). — *McCollum*, The newer knowledge of nutr. 2. Aufl. 1923. New York. — *McCollum-Simmonds, Shipley, Park*, J. of biol. Chem. **47**, 507 (1921). — *Coward*, Quart. J. of Pharm. I. 27. (1928). — *Casparis-Shipley-Cramer*, J. amer. med. Assoc. **1923**. — *Christensen*, Münch. med. Wschr. **44**, 1883 (1928). — *Dodds*, Brit. med. J. **1922**, 3186. —. *Dejust-Stolk-Dureinil*, C. r. Acad. Sci. Paris **187**, 311 (1928). — *Dam*, Biochem. Z. **194** (1928). — *Ekkert*, Pharm. Zentralhalle **69**, 18, 276; **69**, 7, 97 (1928). — *Falkenheim*, Lichtwirkung antirach. Schutzstoffe im leb. Org. 19. H. d. Abhandl. d. Kinderheilk. u. ihrer Grenzgeb. Berlin 1928. — *Forschner-Hottinger*, Münch. med. Wschr. **78**, 4, 156 (1928). — *Freudenberg-György*, Erg. inn. Med. **42** (1923). — *Freudenberg-Welker*, Z. Kinderheilk. **65**, 271 (1927). — *György*, Klin. Wschr. **6**, Nr 13 (1927); **8**, Nr 15 (1929). — *Häussler* und *Branchli*, Helv. Chim. Acta **12**, 187 (1929). — *Huldschinsky*, Dtsch. med. Wschr. **1919—1920**; Z. f. Kinderheilk. **26** (1921). — *Hottiger*, Z. Kinderheilk. **44** (1927); **47**, 341 (1929). — *Howland-Kramer*, Mschr. Kinderheilk. **25** (1923). — *Hentschel*, Mschr. Kinderheilk. **34**, 248 (1926); **38**, 67 (1928); Münch. med. Wschr. **1481** (1928). — *Hentschel-Zoeller*, Z. Kinderheilk. **44**, 146 (1927). -- *Hentschel-Ayrer*, Z. Kinderheilk. **45**, 289 (1928). — *Hess*, J. of biol. Chem. **62—70** (1924—1927). — *Holtz*, Klin. Wschr. **6**, 535 (1927). — *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, Handbuch d. physiol. und patholog.-chemisch. Analysen. Berlin 1924. — *Heubner*, Klin. Wschr. **9** (1929). — *Heubner-Holtz*, Klin. Wschr. **10** (1929). — *Heymann*, Wien. klin. Wschr. **46**, 584 (1928). — *Iversen*, Biochem. Z. **109**, 211 (1920); **114**, 297 (1921). — *Jendrassik-Kemeneffi*, Biochem. Z. **201**, 269 (1928). — *König-Lenart*, Jb. Kinderheilk. **65**, 271 (1927). — *Küster-Hörth*, Ber. dtsch. chem. Ges. **4**, 809 (1923). — *Kroetz*, Klin. Wschr. **5**, 236 (1927); **25** (1927). — *Kappel-Liesegang-Mastbaum*, Z. exper. Med. **62**, 688 (1928). — *Morton-Heilbronn-Kamm*, J. chem. soc. **2000** (1927). — *v. Pfaundler*, Münch. med. Wschr. **659**, 721 (1927), 1481 (1928). — *Pohl*, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl. **143** (1926); **185**, (1926); Naturwiss. **433** (1927); *Poulsson-Lövenskiold*, Biochemic. J. **22**, 135 (1928). — *Policard-Péhu*, Bull. Histol. appl. **5**, 266 (1928). — *Rosenheim-Webster*, Biochemic. J. **22**, 762 (1928). — *Rosenheim*, Biochemic. J. **20**, 537 (1926); **23**, 47 (1929). — *Reindl-Walter*, Ann. d. Chem. **460** (1928); **466**, 131 (1928); *Scheunert-Schieblich*, Klin. Wschr. **15**, 684 (1929). — *Schultz*, Z. Kinderheilk. **47**, H. 5. — *Shermann-Pappenheimer*, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **18** (1921); J. of exper. Med. **34**, 189 (1921). — *Stepp-György*, Avitaminosen, Berlin 1927. — *Stepp-Woenkhaus*, Arch. f. exper. Path. **111**, 149 (1923). — *Stoeltzner*, Münch. med. Wschr. **37**, 1584 (1928). — *Sexton*, Biochemic. J. **22**, 1133 (1928). —

Smakula, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl. **1928**. — *Steigmann*, Kolloid-Z. **156** H. 2, (1928). — *Shaer-Kramer*, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **23**, 546. — *Steenbock-Black*, siehe Brock u. Welker, Z. Kinderheilk. **43**, 193 (1927). — *Thannhauser-Schaber*, Z. physik. Chem. **127**, 271 (1923); *Ullrich*, Z. Kinderheilk. **47**, 105, 581 (1929); Münch. med. Wschr. **1481** (1928). — *Windaus*, Med. Ges. Göttingen 13. I. 1927; Klin. Wschr. **1927**; Z. angew. Chem. **40**, 697 (1927); Ber. dtsch. chem. Ges. **42**, 238 (1909); Z. phys. Chem. **65**, 110 (1910). — *Windaus-Hess*, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl. **175** (1926). — *Windaus-Linsert*, Ann. Chem. **465**, 148 (1928). — *Windaus-Holtz* (Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl. **1927**, H. 2. — *Windaus-Bourgeaud-Brunken*, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl. **1927**, S. 1. — *Windaus-Rahlén*, Z. physiol. Chem. **101**, 223 (1918). — *Warkany*, Z. Kinderheilk. **46**, 1 (1928); **46**, 716 (1928); Biochem. Z. **190**, 336 (1927). — *Weigert*, Optische Methoden der Chemie. Leipzig 1927. — *Webster-Bourdillon*, Biochemic. J. **22**, 1221 (1928). — *Willimott-Wokes*, Quart. J. Pharm. **1**, 188 (1928). — *Wiskott*, Münch. med. Wschr. **1145** (1928). — *Wokes*, Biochemic. J. **22**, 830 (1928).

Nachtrag: *Bourdillon, Fischmann, Jenkins* u. *Webster*, Proc. roy. Soc. **104** (1929). — *Flury*, Biochem. Z. **203**, 14 (1928). — *King, Rosenheim* u. *Webster*, Biochemic. J. **23**, 166 (1929). — *Rosenheim*, Biochemic. J. **21**, Nr 6 (1927). — *Rosenheim* u. *Schuster*, Biochemic. J. **21**, 1329 (1927). — *Rosenheim* u. *Webster*, Biochemic. J. **20**, 537 (1926); **21**, 389 (1927); **22**, 762 (1928); **22**, 1426 (1928). — *Scheunert* u. *Schieblich*, Biochem. Z. **209**, 290 (1929). — *Schmidtmann*, Klin. Wschr. **8**, 1691, (1929). — *Webster* u. *Bourdillon*, Biochemic. J. **22**, 1223 (1928).

München, Laboratorium der Univ.-Kinderklinik.

Lebenslauf.

Als Sohn des Kaufmannes Moritz Schindel wurde ich am 30. 4. 1906 in München geboren. Dort besuchte ich vom Herbst 1916 bis Herbst 1919 das Humanistische Wilhelmsgymnasium und anschließend bis zum Frühjahr 1925 das Neue Realgymnasium, wo ich im März 1925 die Reifeprüfung ablegte. Von den zehn medizinischen Studiensemestern verbrachte ich die ersten drei in München, übersiedelte dann nach Freiburg und bestand dort nach dem vierten vorklinischen Semester im Frühjahr 1927 die ärztliche Vorprüfung und das Turn- und Sportlehrerexamen. Nach dem ersten klinischen Semester in Freiburg studierte ich vom W.-S. 1927/28 ab wieder in München, wo ich im Frühjahr 1930 mein Staatsexamen abzulegen gedenke.

Vorliegende Arbeit wurde als Bearbeitung der von der medizinischen Fakultät der Universität München im Jahre 1928/29 gestellten Preisaufgabe mit dem vollen Preis bedacht.
